

D7

**Kourilsky et al., German patent
No. DE 2915082 C2**

② BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑪ DE 29 15 082 C 2

⑤ Int. Cl. 4:
G 01 N 33/68

⑰ Aktenzeichen: P 29 15 082.1-52
⑱ Anmeldetag: 12. 4. 79
⑲ Offenlegungstag: 31. 10. 79
⑳ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 13. 7. 89

DE 29 15 082 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑳ Unionspriorität: ⑳ ⑳ ⑳
13.04.78 FR 7810975

㉑ Patentinhaber:
Institut Pasteur, Paris, FR

㉒ Vertreter:
Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Tauchner, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann, D., Dipl.-Phys
Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte, 8000 München

㉓ Erfinder:

Kounisky, Philippe; Avrameas, Stratis; Cami, geb.
Contamine, Brigitte; Guesdon, Jean-Luc, Paris, FR

㉔ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
US 40 02 532

㉕ Verfahren, Verwendung eines Reagenzsatzes und Reagenz zum Nachweis und zur Charakterisierung von
Nukleinsäuren und ihren Sequenzen

DE 29 15 082 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz oder eines Nukleinsäure-Fragments gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1. Sie betrifft ferner die Verwendung eines Reagenzsatzes zur Durchführung des Verfahrens und ein Reagenz zur Verwendung in dem Verfahren.

Jede biologische Probe, beispielsweise Blut, das einem Lebewesen entnommen werden kann, enthält verschiedene Nukleinsäuren in außerordentlicher Reichhaltigkeit. Dies trifft auch für verschiedene Sequenzen zu, beispielsweise zahlreiche Gene, die jede einzelne Nukleinsäure in diesen Proben enthalten kann. Daher kann der Genetiker auf große Schwierigkeiten beim Aufspüren oder bei der Charakterisierung von bestimmten Nukleinsäuren in einer Probe stoßen. Die Schwierigkeiten werden noch größer, wenn es darum geht, die Anwesenheit bestimmter Fragmente, beispielsweise der in diesen Nukleinsäuren enthaltenen Gene, zu charakterisieren.

Um eine einzelne Nukleinsäure oder einzelne Gene — beispielsweise im Hinblick auf Studien der Organisation genetischer Sequenzen der DNA, in der sie enthalten sind — zu charakterisieren, benötigt man zunächst eine mit dieser Nukleinsäure angereicherte, aus der untersuchten Probe erhaltene Fraktion. Zu diesem Zweck wurden bereits Anreicherungsverfahren vorgeschlagen, die sich die Hybridisierungsreaktionen zwischen der gesuchten Nukleinsäure bzw. dem Gen und einem Indikator zunutze machen, sofern ein solcher Indikator verfügbar ist und die erhaltenen Hybride sodann von der Probe abgetrennt werden können, beispielsweise durch differentielle Sedimentation aus einer Lösung mittels Ultrazentrifugieren.

Solche Indikatoren wurden bereits beschrieben: Es handelt sich dabei im allgemeinen um Ribonukleinsäuren (RNA), beispielsweise solche, die mittels genetischer Transkription von Strukturgenen erhalten wurden. Die Strukturgene sind Bestandteile der DNA der einzelnen Zellorganismen, aus denen sie stammen. Die DNA ist demnach geeignet, ihrerseits in die Proteine, für welche die Strukturgene codieren, "übersetzt" zu werden. Es ist bekannt, daß die RNA-Nukleotid-Sequenzen zu der Sequenz der DNA, von der sie abstammen, komplementär sind. Dies zeigt sich in der Eigenschaft der RNA, gemischte Hybride mit den entsprechenden Sequenzen der zugehörigen DNA zu bilden, die zuvor denaturiert worden ist, soweit diese anfangs doppelseitig war, beispielsweise nach Inkubation bei hoher Ionenstärke und erhöhter Temperatur oder in basischem Milieu.

Es wurde vorgeschlagen, den Nachweis von gebildeten Hybriden mit Hilfe einer radioaktiven Markierung der Gene selbst oder der RNA-Indikatoren vorzunehmen. Die Durchführung dieser Methoden ist jedoch nicht einfach, und außerdem ist es dabei nicht immer möglich, die Gene innerhalb der DNA ausreichend zu lokalisieren.

Um die untersuchten Gene in der sie enthaltenden DNA besser lokalisieren zu können und eine Methode zur Bildung von mit bestimmten DNA-Segmenten angereicherten Fraktionen — ausgehend von derselben DNA — zu entwickeln, haben Manning et al eine Methode zum physiko-chemischen Nachweis dieser Gene vorgeschlagen. Diese Methode besteht aus der chemischen Modifizierung des RNA-Indikators durch Anheftung von Biotingruppen, d. h. Derivaten des Cytochrom C. Diese Biotingruppen heften sich durch Brückenbildung bei der Hybridisierung an die DNA an und sind nun physikalisch im Elektronenmikroskop als Staubeilchen, die aus submikroskopischen Kügelchen von einem Durchmesser von 60 nm bestehen, insbesondere auf einem Untergrund von Polymethacrylsäureester nachweisbar. Die Kügelchen wurden zuvor chemisch modifiziert und kovalent an Avidin-Moleküle gebunden. Diese Methode ist in "A New Method of in situ Hybridization", Chromosoma, Springer Verlag (Berlin), Bd. 53 (1975), S. 107 bis 117 und in "A Method for Gene Enrichment Based on the Avidin-Biotin Interaction, Application to the Drosophila Ribosomal RNA Genes", Biochemistry, Bd. 16 (1977), Nr. 7, S. 1364 — 1369 beschrieben.

Die Inkubation der Hybride, die durch Biotin und Avidin modifiziert sind, macht es möglich, die Stelle der gesuchten Gene in der sie enthaltenden DNA zu "markieren" und sie innerhalb der globulären Struktur der DNA nachzuweisen. Diese ist ebenfalls im Elektronenmikroskop sichtbar infolge der sehr starken nicht kovalenten Interaktionen, die nach wie vor an den Stellen herrschen, die frei von Biotin und Avidin geblieben sind.

Diese Methode ist jedoch kaum dazu geeignet, rasch zu bestimmen, ob derartige Gene bzw. DNA in einer biologischen Probe menschlicher oder tierischer Herkunft anwesend sind oder nicht. So ist beispielsweise eine rasche Diagnose einer Infektion, von welcher der Wirt möglicherweise befallen ist, oder der Tatsache, ob ein Gen oder beispielsweise eine DNA-Sequenz in diesem Wirt unverändert geblieben ist oder nicht nach der Methode schwer möglich.

Konjugate aus Enzymen und Makromolekülen und ihre Anwendung für analytische Zwecke sind in US-A 40 02 532 beschrieben. Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz oder eines Nukleinsäure-Fragments sowie ein Reagenz zur Verwendung in dem Verfahren zur Verfügung zu stellen, die mit einfachen Mitteln von Laboranten ohne besondere Ausbildung angewandt werden können. Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Die Erfindung betrifft somit den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand.

Natürlich darf die chemische Modifizierung die gegebenenfalls zusätzlich stattfindende Hybridisierung des Indikators mit der gesuchten DNA-Sequenz bzw. dem DNA-Fragment nicht behindern.

Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß mit dieser Methode die Möglichkeit gegeben ist, rasch festzustellen, ob in einer biologischen Probe das DNA-Gen bzw. DNA-Fragment, das dem verwendeten Indikator entspricht, vorhanden ist oder nicht, und dies sogar bei Anwesenheit einer großen Anzahl anderer Nukleinsäuren. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, daß durch den Nachweis aufgrund der enzymatischen Aktivität, wobei das Enzym durch das Substrat an das Hybrid gebunden ist, umfassende Anwendungsmöglichkeiten gegeben sind.

Nach einer ausreichenden Reinigung des Hybrids ist es sogar möglich, Angaben über die Konzentration der gesuchten DNA in der untersuchten biologischen Probe bzw. über die Anzahl der Kopien des gesuchten Gens in der gereinigten DNA zu erhalten, und zwar durch Bestimmung der Enzymaktivität.

Bei einer zu untersuchenden Nukleinsäureprobe kann man zunächst die Hybridisierung durchführen. Dann kann die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym stattfinden. Man kann vor Bestimmung der Enzymaktivität den gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator bzw. das überschüssige mit dem Indikator nicht umgesetzte Enzym abtrennen oder abbauen.

Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Abtrennung oder der Abbau des überschüssigen nicht hybridisierten Indikators gegebenenfalls vor der Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym erfolgen.

Der spezifische Indikator kann aus RNA oder einzelsträngiger DNA bestehen. Verwendet man eine ursprünglich doppelsträngige DNA (oder RNA) als Indikator, so muß er vorher durch an sich bekannte Methoden denaturiert worden sein.

Führt man eine chemische Modifizierung des Indikators mit Biotin durch, so kann man die Methode nach Manning et al (a. a. O.) mittels des Cytochrom C (durchschnittlich ein Molekül Biotin pro etwa 100 Nukleotide) anwenden.

Vorzugsweise verwendet man zum Markieren des Hybrids durch das Enzym den Komplex (Kupplungsprodukt), der sich nach der Methode von Avrameas (beschrieben in Immunochemistry, Bd. 6 (1969), S. 43—52) aus Avidin und dem Enzym, insbesondere der β -Galactosidase, ergibt.

Man kann natürlich auch andere chemische Modifizierungsmethoden für den Indikator und gegebenenfalls das Enzym im Hinblick auf deren Bindung, vorzugsweise nach der Hybridisierungsreaktion, verwenden und kann die modifizierenden Mittel für Indikator und Enzym umgekehrt verwenden.

Es kommen noch andere Paare von modifizierenden Mitteln für Indikator und Enzym in Frage, für die nachstehend einige Beispiele angegeben sind. Das erste dieser Mittel wird vorzugsweise jeweils zur chemischen Modifizierung des Indikators und das zweite zur chemischen Modifizierung des Enzyms eingesetzt. Der Indikator kann beispielsweise nach einer bekannten Methode durch Metallionen, wie Quecksilberionen, modifiziert werden, und der Nachweis wird mittels eines Enzyms durchgeführt, das Sulfhydrylgruppen ($-SH$) aufweist oder an einen solche Gruppen enthaltenden Träger gebunden ist.

Man kann beispielsweise folgendermaßen vorgehen, wenn die zu untersuchende Probe nur aus wenigen Millilitern Blut besteht: Die Erythrocyten werden lysiert, und die DNA wird nach üblichen Methoden extrahiert. Sodann wird eine kleine Menge der erhaltenen DNA, beispielsweise 1 bis 100 μ g, mit 0,1—0,3 N NaOH denaturiert, die Lösung anschließend neutralisiert und auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit dem der gesuchten DNA oder dem DNA-Fragment entsprechenden Indikator versetzt, und zwar etwa 1 μ g Indikator pro 100 μ g denaturierte DNA (die Menge der gebrauchten NaOH richtet sich nach dem Anteil der gesuchten DNA in der zu analysierenden Probe). Die Lösung wird sodann mit Salzen versetzt, um ein hohes Ionenmilieu zu erreichen, nämlich mit mindestens 0,3 in Gegenwart von 50% Formamid und eines Chelatbildners in geringer Konzentration. Das Volumen soll vorzugsweise gering sein. Die Hybridisierung kann sodann bei der hierfür üblichen Temperatur 1 bis 40 Stunden (normalerweise 16 Stunden) durchgeführt werden. Man kann auch die Methode nach Manning (a. a. O.) oder andere Hybridisierungsmethoden anwenden, beispielsweise die Methode nach Kohne et al (Biochemistry, Bd. 16 (1977), S. 5329—5341), die bei der hierfür üblichen Temperatur in einer phenolhaltigen Emulsion durchgeführt wird.

Anschließend wird an ein Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase, gebundenes Avidin zugesetzt, und zwar unter Bedingungen, welche die Bindung des Biotins am Indikator an die freien Gruppen des Avidins des Komplexes ermöglichen.

Der nicht hybridisierte Indikator wird anschließend vom hybridisierten Indikator nach üblichen Methoden abgetrennt, beispielsweise durch Ausfällen mit Polyäthylenglykol, Gelchromatographie beispielsweise mit Sepharose, oder Ultrazentrifugieren. Andererseits kann der nicht hybridisierte Indikator vor der Bindung des Avidins, welches das Enzym mit den an den hybridisierten Indikator gebundenen Biotingruppen trägt, an die DNA abgetrennt werden.

Man kann das gegebenenfalls fixierte Enzym und dementsprechend die gegebenenfalls stattfindende effektive Hybridisierung des Indikators mit der untersuchten DNA nachweisen, indem man ein Enzymsubstrat, insbesondere Orthonitrophenolgalactosid (ONPG), mit der Lösung in Berührung bringt.

Sobald die Versuchsbedingungen festgelegt sind, ist es natürlich möglich, eine meßbare Aktivitätsschwelle zu bestimmen, beispielsweise durch eine kolorimetrische oder fluorographische Methode. Oberhalb dieser Schwelle kann auf die Anwesenheit der gesuchten DNA oder des DNA-Fragments in der behandelten Probe geschlossen werden.

Das nachstehend beschriebene im Labor durchgeführte Versuchsbeispiel dient zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Versuchsbeispiel

Der Versuch dient dem Nachweis einer Maus-DNA durch Hybridisierung dieser DNA mit ribosomaler Maus-RNA als Indikator. 100 μ g Maus-DNA pro 100 μ l wäßrige Lösung werden durch Versetzen mit 10 μ l 1 M NaOH denaturiert. Nach 10 Minuten wird die Lösung mit 10 μ l 1,5 M Natriumphosphorsäure (NaH_2PO_4) versetzt und auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Die denaturierte DNA-Lösung wird sodann mit 1 μ g ribosomaler RNA, die mit Biotin mittels Cytochrom C (hergestellt nach der Methode von Manning et al.) markiert ist, versetzt. Das Volumen wird mit Wasser auf 160 μ l gebracht. Dann werden 40 μ l einer Mineralsalzlösung in einer Konzentration von $20 \times$ SSC (Standard Saline Citrate) und 200 μ l redistilliertes oder deionisiertes Formamid zugegeben. Die Lösung $1 \times$ SSC ist eine wäßrige Lösung von 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat, bei einem pH-Wert von 7,0. Das Gemisch wird 16 Stunden bei üblicher Temperatur inkubiert, dann bei 4°C

gegen $2 \times$ SSC dialysiert und anschließend 8 Stunden gegen 500 ml Pufferlösung, die 0,1 M Phosphat, 1 M Na^+Cl und 0,01 M Äthylendiamintetraessigsäures Natrium (EDTA) enthält, bei einem pH-Wert von 7,0 dialysiert. Letztere Dialyse wird zweimal wiederholt und je 8 Stunden durchgeführt. Die erhaltene Lösung wird eine Stunde bei üblicher Temperatur mit pankreatischer Ribonuclease inkubiert. Die Ribonuclease-Konzentration beträgt 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Durch diese Behandlung kann nicht hybridisierte RNA abgebaut werden.

Sodann werden 1 mg/ml Cytochrom C-Lösung und 1 μl einer Lösung, die in 1 mg/ml Avidin und 2 mg/ml β -Galactosidase enthält, zugegeben. Dabei erweist sich, daß eines von 7 Molekülen β -Galactosidase an Avidin gebunden ist. Die Lösung wird gerührt und sodann 4 Stunden bei 4°C stehen gelassen.

Anschließend wird mit Phosphat-Dialysepuffer auf 10 ml verdünnt, und die erhaltene Lösung wird eine Stunde bei 35 000 U/Min. zentrifugiert (im Beckman Rotor SW 41). DNA- und RNA-Hybride finden sich im Niederschlag zusammen mit den an diese RNA gebundenen Avidin- β -Galactosidase-Komplexen. Der Überstand enthält nicht hybridisierte und durch Ribonuclease abgebaute RNA sowie ungebundene Avidin und β -Galactosidase.

Der Niederschlag wird abgetrennt und erneut in 10 ml Pufferlösung suspendiert und zentrifugiert. Anschließend wird der Niederschlag in 0,5 ml Puffer aufgenommen (Tube Nr. 1). Sodann wird die Aktivität der β -Galactosidase beim Umsetzen des Substrats ONPG nach der Methode von Müller (Experiments in bacterial genetics (1972), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) durch Messung der optischen Dichte der Lösung bei 420 m μ bestimmt, und zwar nach mindestens 30minütiger Inkubation bei 37°C . Es werden unter genauer Einhaltung der vorgenannten Bedingungen Kontrollproben hergestellt, wobei jedoch beim ersten Kontrollversuch die Zugabe der ribosomalen RNA (Tube Nr. 2) und beim zweiten Kontrollversuch die Zugabe der Maus-DNA (Tube Nr. 3) weggelassen wird. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle

Tube Nr.	Inhalt		Optische Dichte bei 420 m μ , nach 30 Min., bei 37°C
	DNA	RNA	
1	+	+	0,45
2	+	-	0,14
3	-	+	0,15

*) + und - in der DNA- und RNA-Spalte deuten jeweils an, ob die DNA bzw. RNA in der ursprünglichen Lösung vorhanden war oder nicht.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die in der (das Hybrid enthaltenden) Tube Nr. 1 gemessene optische Dichte signifikant höher ist als bei den Kontrollproben.

Das Versuchsbeispiel erläutert also die Bedingungen, unter denen die gegebenenfalls anwesende DNA bzw. das DNA-Fragment nachgewiesen werden kann, sofern ein komplementärer Indikator dieser DNA bzw. des DNA-Fragments verfügbar ist, und zwar durch eine einfache Methode, die weder kompliziertes Labormaterial noch besonders große fachmännische Erfahrung erfordert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann bei diagnostischen in vitro-Verfahren zum Nachweis verschiedener Viren, wie Herpes, Epstein Barr, Pox-Virus, Cytomegalo, in biologischen Proben (wie Blutproben, Stuhlproben) besonders vorteilhaft angewandt werden. Es kann ferner für die Diagnose bestimmter chromosomaler Anomalien angewandt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiterhin zur Feststellung der bakteriellen Diagnose, insbesondere bei Trägern pathogener Gene, seien sie exprimiert, nicht exprimiert oder latent, angewandt werden.

Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß beim Suchen einer infektiösen DNA rasch auf den Erkrankungsgrad einer erfindungsgemäß behandelten biologischen Probe im Hinblick auf die gesuchte Nukleinsäure bzw. deren Fragmente schließen kann, wenn keine Induzierung oder zumindest keine Überschreitung der Aktivitätsschwelle auf dem farbigen Substrat festgestellt wird, sei es durch Versuche, sei es durch Vergleich mit den virusfreien Kontrollproben.

Umgekehrt kann die festgestellte nicht vorhandene Aktivität hinsichtlich des farbigen Substrats, insbesondere oberhalb der vorgenannten Schwelle, in einem anderen bereits angesprochenen Bereich Anwendung finden: Sie kann die Anwesenheit einer Anomalie gesuchter chromosomaler Abnormalität durch die festgestellte nicht vorhandene gesamte oder partielle Hybridisierung zwischen Indikator und untersuchter DNA anzeigen.

Beispielsweise kann man für medizinische Labors Reagenzsätze ("Kit") mit allen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens notwendigen Reagentien zur Verfügung stellen. Solche Reagenzsätze können insbesondere Muster für Indikatoren enthalten, die beispielsweise den DNA von gut erforschten pathogenen Viren oder Bakterien entsprechen, und sogar für Indikatoren, die den besonderen Genen entsprechen, die normalerweise in biologischen zu untersuchenden Proben wie Blut enthalten sind.

Wie bereits erwähnt, sollte der modifizierte Indikator vorzugsweise ein Indikator sein, an den Biotin gebunden ist und wobei das modifizierte Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase, selbst an das Avidin gebunden ist.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein neues Reagenz. Dieses besteht aus einem Komplex aus einem Enzym

(dessen Aktivität im Hinblick auf insbesondere ein farbiges Substrat nachgewiesen werden kann) und einem Indikator (RNA oder einzelsträngige DNA), sei es die Bindung erfolgt direkt, sei es mit Hilfe eines komplexbildenden Mittels zur industriellen Verwendung. Dabei kann das Enzym, wie z. B. β -Galactosidase, über einen Komplex aus Avidin und Biotin an den Indikator gebunden sein (vgl. die Ansprüche 10 und 11).

Die Erfindung kann noch in anderen Bereichen Anwendung finden, insbesondere bei der Markierung bestimmter DNA-Fragmente in bekannten genetischen Versuchen zur Bestimmung des Genotyps der in Frage stehenden DNA. Sie kann insbesondere Anwendung finden bei der Bestimmung, ob ein besonderes DNA-Fragment in genetischen Ausleseversuchen inkorporiert ist oder nicht. Bei diesen Ausleseversuchen geht es beispielsweise um Transformationen von Zellen mittels fremder DNA, die das betreffende DNA-Fragment enthält, oder aber um Transduktionsversuche, bei denen DNA-Fragmente, die normalerweise in der zellulären DNA enthalten sind, in die virale DNA übergehen, mit der die Zellen infiziert worden sind. Eine solche Anwendung ist natürlich nur möglich, wenn man über einen Indikator verfügt, der das komplementäre RNA- bzw. DNA-Fragment des Fragments der gesuchten Nukleinsäure ist.

Gemäß einer anderen Ausführungsform kann man das Verfahren zum Nachweis des Hybrids aus der gesuchten DNA und dem Indikator, mittels eines an ein Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase, gebundenen Antihybrid-Antikörpers anwenden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz oder eines Nukleinsäure-Fragments in einem Gemisch unterschiedlicher Nukleinsäuren durch Hybridisierung der Sequenz oder des Fragments mit einem eine komplementäre Nukleinsäure (DNA oder RNA) enthaltenden Indikator, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) einen chemisch modifizierten Indikator verwendet, der vor oder nach der Hybridisierungsreaktion an ein Enzym gekoppelt werden kann,
 - b) daß die Hybridisierungsreaktion durch Zusammenbringen des chemisch modifizierten Indikators mit der vorgenannten Sequenz oder dem Fragment in Gegenwart anderer, in der Probe enthaltener Nukleinsäure, gegebenenfalls nach vorherigem Denaturieren der Nukleinsäuren, erfolgt, und
 - c) daß nach dem Abbau oder der Abtrennung eines evtl. Überschusses des nicht-hybridisierten Indikators das Hybridisierungsprodukt mit einem Enzymsubstrat zum Nachweis der Nukleinsäure-Sequenz oder des Nukleinsäure-Fragments in Kontakt gebracht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das Enzym im Hinblick auf seine Fähigkeit auswählt, auf ein farbiges Substrat einzuwirken, und daß man die Umwandlungsrate des Substrats, die der Menge der nachzuweisenden Nukleinsäure in der Ausgangsprobe korrelierbar ist, durch optische oder analoge Analyse bestimmt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man den Indikator durch eine chemische Gruppe modifiziert, die mit dem Enzym oder einem Molekül, das stabil mit dem Enzym verbunden ist, einen stabilen Komplex bilden kann.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man sowohl als chemische Gruppe als auch als Molekül Biotin oder Avidin verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Enzym die β -Galactosidase verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst die Hybridisierung, dann die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym durchführt und anschließend den gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator abtrennt bzw. abbaut.
7. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst die Hybridisierung und anschließend nach Abtrennung bzw. Abbau des gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikators die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym durchführt.
8. Verwendung eines Reagenzsatzes zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Bestandteile aufweist:
 - a) mindestens einen Indikator aus einer RNA oder einer einzelsträngigen oder denaturierbaren DNA, die charakteristisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz oder deren Fragment, wobei dieser Indikator im Hinblick auf seine Bindung mit einem Enzym chemisch modifiziert ist,
 - b) das gegebenenfalls modifizierte Enzym, das für die Bindung mit dem Indikator verwendet wird,
 - c) ein insbesondere farbiges Substrat, das für das Enzym spezifisch ist,
 - d) Reagenzien, die für die Zellyse, insbesondere bei der Untersuchung von Blut, und für die Extraktion von Nukleinsäuren erforderlich sind.
9. Verwendung eines Reagenzsatzes nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß er eine an Biotin gebundene RNA oder DNA als Indikator und ein Kupplungsprodukt von Avidin und einem Enzym, wie β -Galactosidase, enthält.
10. Reagenz zur Verwendung im Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, gekennzeichnet durch einen Komplex aus einem Enzym, das durch seine Fähigkeit mit einem Substrat insbesondere einem farbigem Substrat zu reagieren, nachweisbar ist, und einem Indikator aus einer RNA oder DNA, der chemisch so modifiziert ist, daß er mit dem Enzym gekoppelt werden kann, wobei der Indikator selbst mit einer Sequenz oder einem Fragment einer komplementären Nukleinsäure in einem Nukleinsäuregemisch durch eine Hybridisierungsreaktion reaktionsfähig ist.
11. Reagenz nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym über einen Komplex aus Avidin

PS 29 15 082

und Biotin an den Indikator gebunden ist.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.